

## 兒童及新生兒急重症之高速次世代基因診斷

兒童及新生兒急重症，尤其是由遺傳疾病引起者，是婦幼醫療中極具挑戰的一塊。病人如果是首次發病，在加護病房中隨時有死亡或嚴重後遺症之威脅；但是遺傳診斷通常不能在短時間內確立，使得病人無法立即得到針對其罹患疾病之精準醫療，除了延誤病情也造成醫療資源的大量付出。

本研究的目標是以快速全外顯子定序(whole exome sequencing, WES)，及時診斷兒童及新生兒急重症遺傳疾病。其工作重點包含提高 WES 之效率及速度、定序資料之快速運算、輔助判讀程式之開發、判讀人才之訓練及技術之精進、及相關倫理議題之研究。我們成功建立了遺傳疾病高速 NGS 診斷及判讀流程、NGS 輔助判讀程式之開發，並建立了 NGS 診斷之倫理準則。

WES 一般要三個月才有報告，一個原因是因為定序服務商需要累積檢體送到韓國或大陸用大型定序儀定序以節約成本。因此我們使用 Illumina NextSeq 定序儀在台灣上機，其 mid-output 適合每次定序三個檢體，只需要一天的時間。每三個檢體成本約為常規定序的兩倍，同時定序患者及父母親(trio)也比較容易確認變異的意義。因為檔案傳輸國網的速度很慢，為了定序資料之運算(pipeline)，我們優化電腦設備使其適合大量資料的運算，在計畫的後期也引進 NVidia DGX station/Parabricks 運算。我們在精進判讀能力的同時開發了自己的輔助判讀程式(MViewer)，包含序列之註解、變異之篩選、及人工智慧評估變異和患者病情之關聯性。(電腦軟硬體相關工作我們也得到科技部人工智慧計畫的支持)。因此，我們得以做快速而且精準的判讀，許多及時的診斷對於臨床的工作有著極大的幫助。我們的團隊多次參加科學及醫學展覽，屢屢獲獎包括醫策會的智慧醫療金獎以及國家新創獎。我們的成果已經發表在小兒科優良期刊 Pediatric Critical Care Medicine，我們也完成了台灣次世代定序基因檢測與諮詢之倫理與準則的發表。本計畫(106/05/01 - 109/9/30)一共執行了 112 例，有 58 例找到遺傳診斷，診斷率為 50.4%。

我們的成績證明了次世代定序在臨床診斷上的效能，以及我們的團隊執行次世代定序診斷的能力。因此我們的全外顯子定序以及快速 trio 全外顯子定序，都已經通過台大醫院以及衛生局的審核，成為正式的自費醫令，可以為病人提供高優質的精準醫療服務。為了減輕罕見疾病患者的負擔，我們也為他們尋找到費用的補助。在此我們要感謝科技部的支持，能讓罕病全外顯子定序基因診斷進入商業化的營運，以提供長久穩定的服務。

# 陳燕彰

現職：陽明大學生命科學系暨基因體科學研究所

副教授

台北榮民總醫院兒童醫學部

遺傳諮詢中心主任

經歷：台北市立聯合醫院仁愛院區小兒科

主治醫師

國立陽明大學微生物免疫學研究所 博士

國立陽明大學遺傳學研究所 碩士

國立陽明醫學院醫學系 醫學士

---

## 建立整體發展遲緩或智能障礙兒童精準基因檢測平台

本計畫以發展遲緩兒童評估中心為收案地點，招募經評估中心評估，最後診斷為不明原因整體發展遲緩或智能發展障礙兒童為受試者，我們利用染色體晶片，次世代基因定序、串聯質譜儀等技術，提供發展遲緩兒童遺傳變異分析的完整解決方案，藉此提升發展遲緩兒童正確的病因診斷，特別是找出具有治療方法的發展遲緩疾病。有了正確的病因診斷，就可以建立更精準的個人化醫療照護，也可提供正確的遺傳諮詢。

我們第一年招募 200 位發展遲緩的個案、第二年和第三各招募了 150 位個案，三年招募了 500 為個案。整體平均染色體晶片分析的陽性率是 19.4%(97/500)。此結果和過去的國外的研究報告類似。

我們也分析了 200 位男性患者的 X 染色體脆折症變異，但都無陽性個案。也分析了 100 女性患者雷特氏症候群基因變異，發現 6 個疑似已知的基因異常。我們利用自行設計的 260 個可治療性疾病的基因組合，分析了 123 個個案，發現 7 個疑似的基因異常變異個案。利用全外顯子定序(whole exome sequencing)方式，分析 80 個案及其父母親，有 40%左右的陽性偵出率。

我們也發展出利用 WES NGS 資料偵測 CNV 的流程與運算公式，WES CNV 的分析，可以偵測出染色體晶片所能偵測出的異常，覆蓋率約 70-100%，而其解析度可以達到單一 exon 的程度，可以發現染色體晶片和 NGS 無法發現的小片段缺失。

我們認為，約有 15~20%左右發展遲緩兒童具有 DNA 套數的變異，利用染色體晶片可以穩定而又效率的偵測出的。若再配合全基因的 NGS 分析，可將陽性檢出率提高到 50-60%左右。而我們開發的 NGS-CNV 分析方法，對 CNV 的偵測，可以比染色體晶片有更高的解析度，進一步的微調，將有機會取代染晶片，單獨利用 WES NGS 一種檢測技術，就找出突變基因，如此將使檢驗步驟更單純也更迅速，同時也可以進一步開發治療方法，進行個人化醫療，以改善病患的病程。

# 王淑麗

現職：國衛院國家環境醫學研究所 研究員

經歷：國際環境流行病學亞洲和西太平洋分會 主席

台灣精準兒童健康協會 理事

國防醫學大學公共衛生學系 合聘教授

高雄醫學大學環境醫學研究中心 合聘教授

中國醫藥大學公共衛生學系 合聘教授

國立聯合大學環境與安全衛生工程 合聘教授

## 以婦幼族群發展異位性皮膚炎及氣喘之精準預防醫學—

### 運用人工智慧建立預測模式和運用 (Precision preventative medicine for atopic dermatitis and asthma in the maternal and child population - Utilization of the predictive model by adapting the artificial intelligence method)

過敏性疾病包括異位性皮膚炎、氣喘、過敏性鼻炎，為兒童最常見的慢性病，台灣的盛行率約 3-4 成。其症狀的反覆出現，除需要長期照護，也常導致學習力下降、生活品質低落，以及大量醫療支出。當中的氣喘會降低肺功能、增加呼吸道感染和慢性阻塞性肺部疾病的風險，也是兒童急診和死亡的重要原因。諸多遺傳與環境因素，特別是吸入性污染物，皆與此過敏性疾病發生率的快速增加有關。研究顯示孕婦及幼兒暴露、和其遺傳因素，乃是孩童致病及其防治之關鍵。

研究中整合了國內 2 個最早建立的大型、完整的出生世代之長期追蹤資料庫，從出生前的孕婦追蹤，到孩童追蹤至 14 歲為止。此研究對象包括國家衛生研究院與台大醫學院於 2001-2005 年間所執行的環境健康之出生世代，共納入約 2,100 對孕婦、及其新生兒。研究中探究孩童異位性皮膚炎、氣喘、過敏性鼻炎過敏性疾病的發生，與胎兒、新生兒時期的空氣品質，遺傳訊息和環境荷爾蒙暴露之相關性。亦運用「微型感測器」與「傳統環境採樣器」進行居家室內、外 PM<sub>2.5</sub> 採樣，數據皆呈現高度之相關性。並與環保署空氣品質數據建立一關係式，是以運用環保署空氣品質監測數據推估家戶空品 PM<sub>2.5</sub> 暴露濃度，用以優化 APP 之功能，提升個人空污暴露推估之精確度。並透過人工智慧機器學習之分析方法，探尋重要的相關因子，以建立孩童過敏性疾病的預測模式；並運用於行動裝置 APP 之開發，以利使用者透過資料的鍵入，預測孩童罹病機率。

研究結果顯示，運用人工智慧技術，在考量環境空氣品質下，孩童過敏性鼻炎與異位性皮膚炎預測能力較好，孩童氣喘的預測則較差；其中又以出生前 NO<sub>2</sub> 的暴露對孩童過敏性疾病的發生影響最為顯著。團隊業已完成行動裝置應用程式(APP)之設計，運用所建立之孩童過敏性疾病預測模式，透過使用者資料的輸入、環境中 PM<sub>2.5</sub> 及重要污染物暴露資料、與個人生理、遺傳等參數，可預測孩童罹患過敏性疾病的機率。

---

## Prognostic biomarkers for Kawasaki disease at the perspectives of microbiota and immune repertoires

---

### Background

Kawasaki disease (KD), an acute vasculitis syndrome, is the most common acquired heart disease in children but its etiology and pathogenesis remain controversial. We investigated microbiota and immune repertoire to delineate their association with KD and coronary arterial lesions.

### Methods

Forty KD patients and 40 age- and sex-matched healthy controls were enrolled. We collected feces and nasopharyngeal swabs to analyze the gut and respiratory microbiota for the healthy controls and KD patients. 16S rRNA-based metagenomic analysis was performed to comprehensively assess the gut and respiratory microbiota variation. Cardiac echography was performed for KD patients to evaluate coronary arterial lesions.

### Results

Gut microbiome diversity in the acute-stage KD patients was significantly lower than in those at the convalescent stage and the controls ( $p=0.005$ ). Acute-stage KD patients had greater *Bacteroides dorei* ( $p=0.001$ ) and *Bacteroides plebeius* ( $p=0.022$ ) abundances in the gut microbiota and greater *Comamonas testosteroni* ( $p=0.045$ ) abundance in the respiratory microbiota but lower *Lactobacillus mucosae* ( $p=0.042$ ) and *Bacteroides acidifaciens* ( $p=0.004$ ) abundances in gut microbiota than the controls. KD patients with coronary arterial dilatation/aneurysm had a higher *Akkermansia spp.* ( $p=0.015$ ) abundance but lower *Lactobacillus spp.* ( $p=0.036$ ) and *Ruminococcaceae UCG* ( $p=0.036$ ) abundances than those without coronary arterial dilatation.

In the part of immune repertoire analysis, we found the expression of B-regulatory cell was significantly lower on KD cases ( $Z\text{-score}>2.5$ ) than that in the control group ( $P=0.039$ , t-test). Two B cell repertoires were identified on KD groups, ASLYCSGGSCYFDY expression peaks in the acute phase, while ARDPSGGYNWFDP expression is more abundant in the subacute and convalescent phases. One IgG signature ARDSSGGYNWFDP was verified on the KD group with coronary arterial dilatation.

### Conclusions

Dysbiosis, decreased diversity and more abundance of *Bacteroides dorei* and *C. testosterone*, plus less *Lactobacillus mucosae* may be associated with KD development. Less abundance of *lactobacilli* was associated with coronary arterial dilation in KD cases. *Lactobacilli*, especially *Lactobacillus mucosae*, may be beneficial for young children to prevent Kawasaki disease and subsequent coronary arterial lesions. Lower expression of B-regulatory cell on those with coronary arterial dilation may be associated with decreased anti-inflammatory response and contributed to systemic inflammatory.

曹珮真

現職：北榮兒童醫學部 新生兒加護病房主任  
台灣兒童胸腔暨重症醫學會 副秘書長  
陽明大學生理學研究所 博士候選人  
經歷：美國波士頓兒童醫院 臨床研究員  
紐約摩根史坦利兒童醫院 臨床研究員

---

從診斷、預防到治療：先天性聽障的全方位精準醫療整合

From diagnosis, prevention to treatment: Integration of comprehensive precision medicine for congenital hearing loss

**Background:** The most common causes of congenital hearing defect included genetic factors and congenital infections, such as cytomegalovirus, in the developed countries. Neonatal hearing-screening program enable early diagnosis and subsequent early intervention, but lack of the etiology survey. The aim of this study focused on implanting a system of precision medicine that can identify the high risk babies more efficiently and accelerate the subsequent schedule of auditory evaluation and treatment. This project also aimed to development novel treatments of hereditary or drug-related hearing loss such as gene therapy / genome editing technique for personalized precision medicine.

**Method and Material:** With a failed hearing screening test, the subjects were enrolled in this project. Saliva samples were collected for cytomegalovirus screening. Dried blood spot was used for serology test of cytomegalovirus and single-nucleotide polymorphism of hearing-deficit related genes. Infants who had either one detected was referred for further auditory brainstem response testing as soon as possible. The others got into further genetic study included hearing-deficit gene panel and Whole Exome Sequencing (WES) / Whole Genome Sequencing (WGS) after confirmed diagnosis of hearing deficit. In the model of gene therapy, this project utilized a novel CRISPER-Cas9 system to correct the point mutation in the GJB2 gene of induced pluripotent stem cell (iPSCs) derived from patient.

**Result:** Of 46 newborns who participated this study in the two-year period, 3 cases were diagnosed as congenital CMV (cCMV) infection (6.5%), 6 GJB2 homozygotes, 1 GJB2 compound heterozygotes, and 1 SLC26A4 compound

heterozygotes. The mean age at diagnosis of cCMV infection diagnosis and detection of mutation hotspots was  $13.7 \pm 7.9$  and  $9.5 \pm 3.9$  days, respectively. There were 15 cases with confirmed diagnosis of hearing deficit and 8 pending report. In addition, there were 162 infants older than 1 month referred from other hospitals. Of these infants 71 cases underwent hearing-deficit gene panel and 2 underwent WES. GJB2 and SLC26A4 were the first and second common mutation noted in this group. In vitro model for genome editing, HEK 293T modified by the CRISPR-Cas9 and iPSC line from patients carrying GJB2 c.109G>A were generated. We designed the sgRNAs targeting the mutated c.109A locus, and found high efficiency of gene editing in both cell lines.

**Conclusion:** This project established a platform to replenish the cause of hearing impairment into 1-3-6 benchmark of hearing detection and intervention, and further to strive to meet a 1-2-3 month timeline. Once the underlying cause of hearing loss is established, it might direct therapeutic decision-making and guide prevention and genetic counseling. Furthermore, iPSC-based in vitro genome editing seems to be a promising paradigm for the precise gene therapy of hearing loss in the future.